

Attorney Docket  
32301 WD 195

PATENT

1c872 U.S. PRO  
09/935799  
08/24/01

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicant(s): Bettina MÖCKEL, et al.

Serial No. : Unassigned

Group Art Unit : Unassigned

Filed: August 24, 2001

Examiner : Unassigned

For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE *cstA* GENE

**CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY**

Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

Sir:

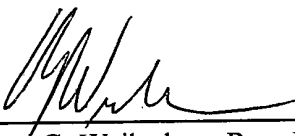
Under 35 U.S.C. §119, Applicants claim the benefit of the filing date of Patent Application 100 42 051.6 filed in Germany on August 26, 2000.

In support of this claim, a certified copy of the German priority application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By :

  
Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531  
1850 M Street, NW - Suite 800  
Washington, DC 20036  
Telephone: (202) 659-2811  
Facsimile: (202) 263-4329

Date : August 24, 2001



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 42 051.6

**Anmeldetag:** 26. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE  
Erstanmelder: Degussa-Hüls AG,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Neue für das cstA-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der  
früherlichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 5. Juli 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Sieck**

### Neue für das *cstA*-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das *cstA*-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das *cstA*-Gen verstärkt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Wenn im folgenden Lysin oder L-Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Base, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das cstA-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Carbon Starvation Proteins A aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

20 Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das cstA-Gen verstärkt ist.

5 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen  
10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge  
15 zu isolieren, die für das Carbon Starvation Protein A kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des cstA-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin  
20 als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das Carbon Starvation Protein A kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz  
25 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

30 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Carbon Starvation Proteins A und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das cstA-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,

aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln.

- 5 Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

- 10 Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
15 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

- 20 und daraus hergestellte L-Lysin produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709  
*Brevibacterium flavum* FERM-P 1708  
*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712  
25 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 und  
*Corynebacterium glutamicum* DSM5715.

- Den Erfindern gelang es, das neue, für das Carbon Starvation Protein A kodierende *cstA*-Gen von *C. glutamicum*  
30 zu isolieren.

Zur Isolierung des *cstA*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.



Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder  
5 dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen *cstA* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin  
10 wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *cstA*-Genproduktes dargestellt.

15 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In  
20 der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des  
25 Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of  
30 Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die

sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

10 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. 15 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der 20 Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ 25 niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C 30 eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise

durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des cstA-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Lysin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird

durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und  
5 amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei  
10 Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei  
Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei  
15 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift  
20 JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße cstA-Gen  
25 beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),  
30 pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS  
35 Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1

(US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch

5 Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des *hom-thrB*-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das

10 vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene

15 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541

20 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm

25 von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology

30 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des

35 betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben dem *cstA*-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 10 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 15 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))),
- 20 • das für eine feed back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (Kalinowski et al. (1990), Molecular and General Genetics 224, 317-324; Accession No.P26512),
- 25 • das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des *cstA*-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- 10 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *cstA*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.



Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur  
5 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen  
10 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des  
15 gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von Lysin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin-  
20 Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von  
25 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring  
30 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

### Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

- beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI  
10 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell  
gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer  
Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,  
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1  
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of  
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
dephosphoryliert.

- Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
25 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
30 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des cstA-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei

das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 2316 Basenpaaren, welches als cstA-

Gen bezeichnet wurde. Das cstA-Gen kodiert für ein Protein von 772 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa-Hüls AG

5 &lt;120&gt; Neue für das cstA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000173 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2718

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (200)..(2515)

&lt;223&gt; cstA-Gen

25

&lt;400&gt; 1

aggatggtat aaatcatctc tcaatgttac ttttccattg ttaagaatta acaactctcg 60

30

gtgatttgtc gcataccag ctgtcaaaga tccgatcatc ggcatacaga aacacccatc 120

tggccgaact ttcttttttc tgcattgcatt tctgcacaca gttttctgcc gctgtttctg 180

cccgctgttt ctacgcata gtg gct ttg aaa cga ccc gaa gag aaa aca gta 232

35

Val Ala Leu Lys Arg Pro Glu Glu Lys Thr Val  
1 5 10

aag atc gtg acc ata aaa cag act gac aac atc aat gac gat gat ttg 280

Lys Ile Val Thr Ile Lys Gln Thr Asp Asn Ile Asn Asp Asp Asp Leu  
15 20 25

40

gtg tac agc aac gct act gac ctt cca gta ggc gtg aag aag tcc cct 328

Val Tyr Ser Asn Ala Thr Asp Leu Pro Val Gly Val Lys Lys Ser Pro  
30 35 40

45

aaa atg tca ccg acc gcc cgc gtt ggt ctc ctt gtc ttt ggg gtt atc 376

Lys Met Ser Pro Thr Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Phe Gly Val Ile  
45 50 55

50

gcg gcg gtg ggt tgg gga gca atc gct ttc tcc cgt ggc gaa aca atc 424

Ala Ala Val Gly Trp Gly Ala Ile Ala Phe Ser Arg Gly Glu Thr Ile  
60 65 70 75

55

aac tct gtg tgg ctg gtt ttg gcg gca gtt ggt tcc tat atc att gcg 472

Asn Ser Val Trp Leu Val Leu Ala Ala Val Gly Ser Tyr Ile Ile Ala  
80 85 90

	ttt tct ttc tat gcc cga ctg att gaa tac aaa gtt gtt aag ccg aaa	520
	Phe Ser Phe Tyr Ala Arg Leu Ile Glu Tyr Lys Val Val Lys Pro Lys	
	95 100 105	
5	gat cag cga gca acc ccg gcg gaa tac gtt aat gac ggc aag gac tat	568
	Asp Gln Arg Ala Thr Pro Ala Glu Tyr Val Asn Asp Gly Lys Asp Tyr	
	110 115 120	
10	gtc cca acg gat cgt cgt gtg ctt ttt ggc cac cac ttt gca gct att	616
	Val Pro Thr Asp Arg Arg Val Leu Phe Gly His His Phe Ala Ala Ile	
	125 130 135	
15	gca ggt gcc ggt cca ttg gtt gga cct gtc atg gcc gcg cag atg ggc	664
	Ala Gly Ala Gly Pro Leu Val Gly Pro Val Met Ala Ala Gln Met Gly	
	140 145 150 155	
20	tac ctg cca ggc acc ttg tgg att atc ctc ggt gtg att ttc gcc ggt	712
	Tyr Leu Pro Gly Thr Leu Trp Ile Ile Leu Gly Val Ile Phe Ala Gly	
	160 165 170	
25	gca gtg cag gac tac cta gtg ctg tgg gtg tct act cgt agg cgt gga	760
	Ala Val Gln Asp Tyr Leu Val Leu Trp Val Ser Thr Arg Arg Arg Gly	
	175 180 185	
30	cgc tca ctt ggc cag atg gtt cgt gat gaa atg ggc acg gtc ggt gga	808
	Arg Ser Leu Gly Gln Met Val Arg Asp Glu Met Gly Thr Val Gly Gly	
	190 195 200	
35	gct gcc ggt atc ttg gcg acc atc tcc atc atg atc atc att atc gcg	856
	Ala Ala Gly Ile Leu Ala Thr Ile Ser Ile Met Ile Ile Ile Ala	
	205 210 215	
40	gtg ctc gca ttg atc gtg gtt aat gca ctg gct gat tca cca tgg ggc	904
	Val Leu Ala Leu Ile Val Val Asn Ala Leu Ala Asp Ser Pro Trp Gly	
	220 225 230 235	
45	gtt ttc tcc atc acc atg acc atc cca att gca ctg ttc atg ggt gtg	952
	Val Phe Ser Ile Thr Met Thr Ile Pro Ile Ala Leu Phe Met Gly Val	
	240 245 250	
50	tac ttg cgt tac ctg cgc cca ggt cgt gtt act gaa gtg tcc atc atc	1000
	Tyr Leu Arg Tyr Leu Arg Pro Gly Arg Val Thr Glu Val Ser Ile Ile	
	255 260 265	
55	ggt gtg gca ctg ctc ctg ctg gct atc gtt gct ggt ggt tgg gtt gca	1048
	Gly Val Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ile Val Ala Gly Gly Trp Val Ala	
	270 275 280	
60	gac acc tca tgg ggc gtg gaa tgg ttc acc tgg tct aag acc act ttg	1096
	Asp Thr Ser Trp Gly Val Glu Trp Phe Thr Trp Ser Lys Thr Thr Leu	
	285 290 295	
65	gcg ttg gcc ttg atc ggt tac gga atc atg gct gcg att ttg ccg gtg	1144
	Ala Leu Ala Leu Ile Gly Tyr Gly Ile Met Ala Ala Ile Leu Pro Val	
	300 305 310 315	
70	tgg ctg ctg ctt gca ccg cgc gat tac ctg tct acc ttt atg aag atc	1192
	Trp Leu Leu Leu Ala Pro Arg Asp Tyr Leu Ser Thr Phe Met Lys Ile	
	320 325 330	



5	ggc gtc atc ggt ctg ttg gca gtg ggt att ttg ttc gca cgt cct gag	1240
	Gly Val Ile Gly Leu Leu Ala Val Gly Ile Leu Phe Ala Arg Pro Glu	
	335 340 345	
10	gtg cag atg cct tcc gtg acc tcc ttc gca ctt gag ggc aac ggt ccg	1288
	Val Gln Met Pro Ser Val Thr Ser Phe Ala Leu Glu Gly Asn Gly Pro	
	350 355 360	
15	gtg ttc tct gga agt ctg ttc cca ttc ctg ttc atc acg att gcc tgt	1336
	Val Phe Ser Gly Ser Leu Phe Pro Phe Leu Phe Ile Thr Ile Ala Cys	
	365 370 375	
20	ggc gca ctg tct ggt ttc cac gca ctg att tct tca gga acc aca cca	1384
	Gly Ala Leu Ser Gly Phe His Ala Leu Ile Ser Ser Gly Thr Thr Pro	
	380 385 390 395	
25	aag ctt gtg gag aag gaa tcc cag atg cgc atg ctc ggc tac ggc ggc	1432
	Lys Leu Val Glu Lys Glu Ser Gln Met Arg Met Leu Gly Tyr Gly Gly	
	400 405 410	
30	atg ttg atg gaa tct ttc gtg gcg atg atg gca ctg atc acc gct gtt	1480
	Met Leu Met Glu Ser Phe Val Ala Met Met Ala Leu Ile Thr Ala Val	
	415 420 425	
35	att ctg gat cgt cac ctg tac ttc tcc atg aac gct ccg ctg gca ctg	1528
	Ile Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ser Met Asn Ala Pro Leu Ala Leu	
	430 435 440	
40	act ggt gga gat cca gca acc gca gct gag tgg gtt aac tcc att ggg	1576
	Thr Gly Gly Asp Pro Ala Thr Ala Ala Glu Trp Val Asn Ser Ile Gly	
	445 450 455	
45	ctg aca ggt gcg gat atc acc ccg gaa cag ctg tcg gaa gct gct gaa	1624
	Leu Thr Gly Ala Asp Ile Thr Pro Glu Gln Leu Ser Glu Ala Ala Glu	
	460 465 470 475	
50	agt gtc gga gaa tcc act gtt att tcc cgt acc ggt ggc gca cca acc	1672
	Ser Val Gly Glu Ser Thr Val Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ala Pro Thr	
	480 485 490	
55	ttg gcg ttc ggt atg tct gaa atc ctc tcc gga ttc atc ggc ggc gct	1720
	Leu Ala Phe Gly Met Ser Glu Ile Leu Ser Gly Phe Ile Gly Gly Ala	
	495 500 505	
60	gga atg aag gcg ttc tgg tac cac ttc gcc atc atg ttt gag gct ctg	1768
	Gly Met Lys Ala Phe Trp Tyr His Phe Ala Ile Met Phe Glu Ala Leu	
	510 515 520	
65	ttc atc ctc act act gtg gat gca ggt act cgt gtg gct cgc ttt atg	1816
	Phe Ile Leu Thr Thr Val Asp Ala Gly Thr Arg Val Ala Arg Phe Met	
	525 530 535	
70	atg acc gat acc ttg ggc aat gtt cca ggt ctg cgc cgt ttc aag gat	1864
	Met Thr Asp Thr Leu Gly Asn Val Pro Gly Leu Arg Arg Phe Lys Asp	
	540 545 550 555	

	cct tca tgg act gtc ggt aac tgg att tct acc gtg ttt gtg tgt gct	1912
	Pro Ser Trp Thr Val Gly Asn Trp Ile Ser Thr Val Phe Val Cys Ala	
	560 565 570	
5	cta tgg ggt gct att ttg ctc atg ggt gtt acc gat cca ctg ggc ggc	1960
	Leu Trp Gly Ala Ile Leu Leu Met Gly Val Thr Asp Pro Leu Gly Gly	
	575 580 585	
10	atc aac gtg ctt ttc cca cta ttc ggt atc gct aac cag ctg ctc gcc	2008
	Ile Asn Val Leu Phe Pro Leu Phe Gly Ile Ala Asn Gln Leu Leu Ala	
	590 595 600	
15	gct att gca ctt gct ctc gtg ctg gtt gtt gtg gtg aag aag ggc ctg	2056
	Ala Ile Ala Leu Ala Leu Val Leu Val Val Val Lys Lys Gly Leu	
	605 610 615	
20	tac aag tgg gcg tgg att cca gct gtt cct ttg gca tgg gat ctc att	2104
	Tyr Lys Trp Ala Trp Ile Pro Ala Val Pro Leu Ala Trp Asp Leu Ile	
	620 625 630 635	
25	gtc acg atg act gcg tca tgg cag aag att ttc cac tct gat ccg gct	2152
	Val Thr Met Thr Ala Ser Trp Gln Lys Ile Phe His Ser Asp Pro Ala	
	640 645 650	
30	att ggc tac tgg gct cag aac gcg aac ttc cgc gat gca aag tct caa	2200
	Ile Gly Tyr Trp Ala Gln Asn Ala Asn Phe Arg Asp Ala Lys Ser Gln	
	655 660 665	
35	ggc ctt acc gaa ttt ggt gcc gct aaa tct cct gag gca atc gat gcg	2248
	Gly Leu Thr Glu Phe Gly Ala Ala Lys Ser Pro Glu Ala Ile Asp Ala	
	670 675 680	
40	gtt atc cga aac acc atg att cag ggc atc ttg tcc atc ctg ttc gcg	2296
	Val Ile Arg Asn Thr Met Ile Gln Gly Ile Leu Ser Ile Leu Phe Ala	
	685 690 695	
45	gtg ctc gtc ctc gtt gtt gtc ggc gca gcc att gcg gtg tgc atc aag	2344
	Val Leu Val Leu Val Val Val Gly Ala Ala Ile Ala Val Cys Ile Lys	
	700 705 710 715	
50	tcc atc agg gct cgt gca gcc gga aca cct ttg gag acc act gaa gag	2392
	Ser Ile Arg Ala Arg Ala Ala Gly Thr Pro Leu Glu Thr Thr Glu Glu	
	720 725 730	
55	cct gat act gaa tct gag ttc ttc gcc cca act gga ttc ctt gca tct	2440
	Pro Asp Thr Glu Ser Glu Phe Phe Ala Pro Thr Gly Phe Leu Ala Ser	
	735 740 745	
60	tcc agg gat aag gaa gtc cag gcc atg tgg gac gag cgc tac cca ggc	2488
	Ser Arg Asp Lys Glu Val Gln Ala Met Trp Asp Glu Arg Tyr Pro Gly	
	750 755 760	
65	ggg ggc ccc gtg tct tct gga ggg cac taaaacatga tggctcttac	2535
	Gly Ala Pro Val Ser Ser Gly Gly His	
	765 770	
70	tcatgcactg tggaaaatcc cgcgggcggt gtggtggtat ctactgagc tcatggggga	2595
75	cacggcgat tccaagtatg tgggtgactt aaagcaccac catccggatg ctccgattcc	2655

10. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.
11. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem  
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der  
Plasmidvektor die für das cstA-Gen kodierende  
Nukleotidsequenz trägt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des  
Polynukleotides, das für das cstA-Gen kodiert  
verstärkt, insbesondere überexprimiert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die  
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids erhöht,  
für das das Polynukleotid cstA kodiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 14.1 das für eine feed back resistente  
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 14.2 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen dapA,
- 14.3 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat  
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 14.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende  
Gen pgk,

- 14.5 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 14.6 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 5 14.7 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 14.8 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1, verstärkt bzw. überexprimiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
10 von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,
- 15 15.2 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase kodierende Gen pgi,
- 15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,
- 15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2  
20 abschwächt.
16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h  
25 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.
18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene

zu isolieren, die für das Carbon Starvation Protein A  
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des  
cstA-Gens aufweisen, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die  
5 Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4  
als Hybridisierungssonden einsetzt.

19. Verfahren gemäß Anspruch 18, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung  
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
10 durchgeführt wird.

**Neue für das cstA-Gen kodierende Nukleotidsequenzen****Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,  
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der  
5 Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit  
einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine  
Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von  
SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
Polynukleotiden von a) oder b), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz  
von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in  
20 denen zumindest das cstA-Gen verstärkt vorliegt, und die  
Verwendung der Polynukleotidsequenzen als  
Hybridisierungs sonden.

tactgagcgg gagtattggc gggcaaagta tgcagatcag gacgctaatac ctgggtgcccg 2715  
ctg 2718

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 772

&lt;212&gt; PRT

10 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;400&gt; 2

Val Ala Leu Lys Arg Pro Glu Glu Lys Thr Val Lys Ile Val Thr Ile  
1 5 10 15  
15 Lys Gln Thr Asp Asn Ile Asn Asp Asp Asp Leu Val Tyr Ser Asn Ala  
20 25 30  
20 Thr Asp Leu Pro Val Gly Val Lys Lys Ser Pro Lys Met Ser Pro Thr  
35 40 45  
Ala Arg Val Gly Leu Leu Val Phe Gly Val Ile Ala Ala Val Gly Trp  
50 55 60  
25 Gly Ala Ile Ala Phe Ser Arg Gly Glu Thr Ile Asn Ser Val Trp Leu  
65 70 75 80  
Val Leu Ala Ala Val Gly Ser Tyr Ile Ile Ala Phe Ser Phe Tyr Ala  
85 90 95  
30 Arg Leu Ile Glu Tyr Lys Val Val Lys Pro Lys Asp Gln Arg Ala Thr  
100 105 110  
35 Pro Ala Glu Tyr Val Asn Asp Gly Lys Asp Tyr Val Pro Thr Asp Arg  
115 120 125  
Arg Val Leu Phe Gly His His Phe Ala Ala Ile Ala Gly Ala Gly Pro  
130 135 140  
40 Leu Val Gly Pro Val Met Ala Ala Gln Met Gly Tyr Leu Pro Gly Thr  
145 150 155 160  
Leu Trp Ile Ile Leu Gly Val Ile Phe Ala Gly Ala Val Gln Asp Tyr  
165 170 175  
45 Leu Val Leu Trp Val Ser Thr Arg Arg Arg Gly Arg Ser Leu Gly Gln  
180 185 190  
50 Met Val Arg Asp Glu Met Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Gly Ile Leu  
195 200 205  
Ala Thr Ile Ser Ile Met Ile Ile Ile Ile Ala Val Leu Ala Leu Ile  
210 215 220  
55 Val Val Asn Ala Leu Ala Asp Ser Pro Trp Gly Val Phe Ser Ile Thr  
225 230 235 240  
Met Thr Ile Pro Ile Ala Leu Phe Met Gly Val Tyr Leu Arg Tyr Leu  
245 250 255

Arg Pro Gly Arg Val Thr Glu Val Ser Ile Ile Gly Val Ala Leu Leu  
 260 265 270  
 5 Leu Leu Ala Ile Val Ala Gly Gly Trp Val Ala Asp Thr Ser Trp Gly  
 275 280 285  
 Val Glu Trp Phe Thr Trp Ser Lys Thr Thr Leu Ala Leu Ala Leu Ile  
 290 295 300  
 10 Gly Tyr Gly Ile Met Ala Ala Ile Leu Pro Val Trp Leu Leu Leu Ala  
 305 310 315 320  
 15 Pro Arg Asp Tyr Leu Ser Thr Phe Met Lys Ile Gly Val Ile Gly Leu  
 325 330 335  
 Leu Ala Val Gly Ile Leu Phe Ala Arg Pro Glu Val Gln Met Pro Ser  
 340 345 350  
 20 Val Thr Ser Phe Ala Leu Glu Gly Asn Gly Pro Val Phe Ser Gly Ser  
 355 360 365  
 Leu Phe Pro Phe Leu Phe Ile Thr Ile Ala Cys Gly Ala Leu Ser Gly  
 370 375 380  
 25 Phe His Ala Leu Ile Ser Ser Gly Thr Thr Pro Lys Leu Val Glu Lys  
 385 390 395 400  
 30 Glu Ser Gln Met Arg Met Leu Gly Tyr Gly Gly Met Leu Met Glu Ser  
 405 410 415  
 Phe Val Ala Met Met Ala Leu Ile Thr Ala Val Ile Leu Asp Arg His  
 420 425 430  
 35 Leu Tyr Phe Ser Met Asn Ala Pro Leu Ala Leu Thr Gly Gly Asp Pro  
 435 440 445  
 Ala Thr Ala Ala Glu Trp Val Asn Ser Ile Gly Leu Thr Gly Ala Asp  
 450 455 460  
 40 Ile Thr Pro Glu Gln Leu Ser Glu Ala Ala Glu Ser Val Gly Glu Ser  
 465 470 475 480  
 45 Thr Val Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ala Pro Thr Leu Ala Phe Gly Met  
 485 490 495  
 Ser Glu Ile Leu Ser Gly Phe Ile Gly Gly Ala Gly Met Lys Ala Phe  
 500 505 510  
 50 Trp Tyr His Phe Ala Ile Met Phe Glu Ala Leu Phe Ile Leu Thr Thr  
 515 520 525  
 Val Asp Ala Gly Thr Arg Val Ala Arg Phe Met Met Thr Asp Thr Leu  
 530 535 540  
 55 Gly Asn Val Pro Gly Leu Arg Arg Phe Lys Asp Pro Ser Trp Thr Val  
 545 550 555 560



Gly Asn Trp Ile Ser Thr Val Phe Val Cys Ala Leu Trp Gly Ala Ile  
 565 570 575  
 5 Leu Leu Met Gly Val Thr Asp Pro Leu Gly Gly Ile Asn Val Leu Phe  
 580 585 590  
 Pro Leu Phe Gly Ile Ala Asn Gln Leu Leu Ala Ala Ile Ala Leu Ala  
 595 600 605  
 10 Leu Val Leu Val Val Val Val Lys Lys Gly Leu Tyr Lys Trp Ala Trp  
 610 615 620  
 Ile Pro Ala Val Pro Leu Ala Trp Asp Leu Ile Val Thr Met Thr Ala  
 625 630 635 640  
 15 Ser Trp Gln Lys Ile Phe His Ser Asp Pro Ala Ile Gly Tyr Trp Ala  
 645 650 655  
 20 Gln Asn Ala Asn Phe Arg Asp Ala Lys Ser Gln Gly Leu Thr Glu Phe  
 660 665 670  
 Gly Ala Ala Lys Ser Pro Glu Ala Ile Asp Ala Val Ile Arg Asn Thr  
 675 680 685  
 25 Met Ile Gln Gly Ile Leu Ser Ile Leu Phe Ala Val Leu Val Leu Val  
 690 695 700  
 Val Val Gly Ala Ala Ile Ala Val Cys Ile Lys Ser Ile Arg Ala Arg  
 705 710 715 720  
 30 Ala Ala Gly Thr Pro Leu Glu Thr Thr Glu Glu Pro Asp Thr Glu Ser  
 725 730 735  
 35 Glu Phe Phe Ala Pro Thr Gly Phe Leu Ala Ser Ser Arg Asp Lys Glu  
 740 745 750  
 Val Gln Ala Met Trp Asp Glu Arg Tyr Pro Gly Gly Ala Pro Val Ser  
 755 760 765  
 40 Ser Gly Gly His  
 770

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das cstA-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2  
enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID  
No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Carbon  
20 Starvation Proteins A aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz  
5 (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,  
und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
10 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das cstA-Gen verstärkt,  
insbesondere überexprimiert wird.
8. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h  
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte  
durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das cstA-Gen oder dafür kodierende  
20 Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
überexprimiert;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium  
oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.